

やぶき まさと

氏名（本籍地）	矢吹 仁人
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第107号
学位授与年月日	平成20年2月6日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科，専攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生命機能科学専攻
論文題目	骨格筋細胞分化における p53 類似遺伝子 p51 の機能解析
博士論文審査委員	（主査）教授 帯刀 益夫 教授 佐竹 正延 教授 十川 和博 准教授 井川 俊太郎

【研究背景・目的】

癌抑制遺伝子 *p53* は、多種類のヒト腫瘍で最も高頻度に変異が検出されることから最も重要な癌抑制遺伝子として注目されている。*p53* タンパク質は転写因子として機能し、DNA 損傷性ストレスに応答して細胞周期停止やアポトーシス誘導など、癌化に関連するシグナルほぼすべてに対してブレーキとして作用することから“ゲノムの守護神”と称される。1998 年に同定された *p53* 類似遺伝子 *p51* は複数のアイソフォームを有し、DNA 損傷による *p53* 依存的なアポトーシスの誘導と四肢形成や皮膚分化に必須であることが報告され、癌抑制遺伝子であると同時に哺乳動物が正常に発生・成熟する上で必要不可欠な遺伝子であることが明らかとなっている。癌細胞の基本動態が発生母組織における増殖・分化制御機構の破綻の結果であることを考えると、癌抑制機能と発生・分化調節機能は密接に関係した事象であり、本研究ではこれらの関係を探る目的で、*p51* を発現する正常組織での *p51* 機能解析を行った。

【筋芽細胞分化時における *p51* アイソフォーム発現の変化】

33 種類のヒト正常組織の cDNA ライブラリーを用いた *p51* 発現解析では、転写活性化能を有する *TAp51* アイソフォームが骨格筋組織にて高発現を示していた。そこで骨格筋前駆細胞である筋芽細胞の分化過程における *p51* アイソフォーム発現の挙動を、複数存在するアイソフォームをそれぞれ識別するプライマーを用いて、分化誘導した C2C12(murine myoblast)、及び L6E9(rat myoblast)から経時的に調製した RNA を鋳型とした RT-PCR 解析により精査した。その結果、 $\Delta Np51B$ アイソフォームの発現が検出不能である一方で、*TAp51A/TAp51B* 両アイソフォームの発現が分化誘導後一日目より顕著に誘導されることを見出した。*TAp51* mRNA は組織特異的な発現分布を示すことから、その活性調節における転写レベルでの調節の重要性が示唆され、本研究では筋芽細胞分化に伴って転写レベルで誘導される *TAp51* の転写制御領域および原因転写因子の同定を行った。

【骨格筋分化時における *TAp51* 遺伝子上流転写制御領域の解析】

まず *TAp51* 遺伝子の翻訳開始点から上流約 3kbp をホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したレポータープラスミドを用いて、C2C12 細胞前後でのプロモーター活性を測定した。その結果、C2C12 細胞分化に伴い筋特異的分化マーカーである *MCK*(Muscle Creatine Kinase) プロモーターが活性化されると同様に、*TAp51* プロモーターが活性化されることを明らかにし、筋分化における *TAp51* mRNA 量の転写レベルで

の調節が示された。次に 5'側からの *TAp51* プロモーター欠失変異体を用いたルシフェラーゼレポーター解析を行った結果、分化後のプロモーター活性に翻訳開始部位より上流 1.7~1.2kbp が必要であることを示した。*TAp51* 遺伝子上流 5'側はこの責任領域にて脊椎動物 17 種類で非常に高い相同性を示しており、何らかの重要な転写因子のコンセンサス配列の存在が示唆され、筋分化に重要な転写因子 MyoD、E47 の結合コンセンサス配列(E-box)が二ヶ所存在することに着目した(以下それぞれを E1(-1502)、E2(-1297)と記す。(±0=翻訳開始点))。これら E-box 配列に変異を導入した *TAp51* プロモーター構築をレポーター解析に用いると C2C12 分化後におけるレポーター活性が激減し、E-box 配列が C2C12 細胞分化後の *TAp51* プロモーター活性に重要であることが判明した。そして E47 または MyoD の強発現により *TAp51* プロモーター活性が E-box 配列依存的に数倍から数十倍に上昇したことから E47、MyoD による *TAp51* プロモーター活性化が *in vitro* で示され、さらに C2C12 細胞での MyoD 強制発現が内在性 *TAp51* mRNA を誘導することを RT-PCR 解析により見出し、筋分化に最も重要な両転写因子が *TAp51* 転写を制御することが *in vivo* で示された。

MyoD、E47 強発現による *TAp51* プロモーター活性化は両者を同時に発現した時はさらに活性化が亢進し、逆に ΔE47(転写活性化領域を欠いた E47 変異体)は活性化を欠くばかりでなく、MyoD による *TAp51* プロモーター活性化を阻害したことから、両者による協調的な *TAp51* プロモーターへの結合および活性化が示唆された。骨格筋を含め多くの組織分化に関わる bHLH 型転写因子は幅広い組織に一様に発現するクラス I (E12、E47)と、組織特異的に発現するクラス II (MyoD、myogenin、NeuroD 等)に分類され、それらは HLH 領域を介してホモダイマー／ヘテロダイマーを形成することが知られており、骨格筋では両者の中でも MyoD と E47 がヘテロダイマーを形成した時に最も強い DNA 結合能と転写活性化能を示すことが知られている。E1、E2 それぞれの E-box 配列への E47、MyoD 蛋白質の結合性をゲルシフトにて解析した結果、E47 および MyoD がヘテロダイマーを形成した時に最も強いシフトバンドが検出され、骨格筋細胞分化時における *TAp51* 転写誘導は MyoD、E47 ヘテロダイマーによる直接的な *TAp51* プロモーター制御がキーステップになると考えられた。

【骨格筋細胞分化時における *TAp51* の機能】

骨格筋分化における *TAp51* 発現上昇の重要性を C2C12 細胞への強制発現実験にて検討した。強制発現実験では転写活性化領域を有し筋分化時に発現が上昇する *TAp51A*/*TAp51B* アイソフォーム及び、転写活性化領域を欠き *TAp51* に対してドミナントネガティブとして機能することが知られる Δ*Np51B* アイソフォームを、CAG プロモータ

一制御下で発現するアデノウイルスベクターを感染することにより C2C12 細胞に強制発現させ、それぞれの強発現が C2C12 分化に与える影響を形態観察および最終筋分化マーカー (*Troponin-T*) の発現によりコントロール (LacZ 感染 C2C12 細胞) と比較した。実験の結果、*TAp51* 強発現による筋管の早期形成が観察され、逆に $\Delta Np51B$ 強発現による筋管形成の顕著な阻害と筋分化マーカーの消失が観察された。*TAp51* 強発現と $\Delta Np51$ 強発現は分化誘導条件において全く逆の影響を示しており、骨格筋分化における TAp51 発現が何らかの機能性を有していることが示唆された。

本研究では *TAp51* の機能解析を発現組織である骨格筋細胞にて行った結果、筋芽細胞分化に伴う *TAp51* 転写誘導を見出し、その発現が筋分化制御因子である E47/MyoD の制御下にあることを見出した。筋分化における機能については解析途中であるものの、これまでの報告と交えて今後の展開について考察する。

癌抑制遺伝子 *p53* の類似遺伝子として同定された *p51* は、*p53* と構造的・機能的な類似性を持ち、癌抑制遺伝子機能を示すとともに、正常の発生・分化で必要不可欠な遺伝子であることが明らかとなっている。矢吹仁人は、*p51* を発現する正常組織である骨格筋での *p51* の役割について、その遺伝子転写制御機構と分化制御機能の解析を行った。

まず、*p51* を発現する組織は骨格筋や精巣、前立腺や胎盤などに限られており、転写活性化能を有する *TAp51* アイソフォームが骨格筋組織において最も高い発現を示していることを明らかにした。そして、骨格筋前駆細胞の分化過程における *p51* アイソフォーム発現の挙動を解析した結果、皮膚分化では重要な $\Delta Np51B$ の発現が検出されないのに対して、*TAp51A/TAp51B* の発現が顕著に誘導されることを見出した。

そこで、*TAp51* の骨格筋特異的発現を規定する遺伝子制御領域とその転写調節因子の同定を行った。まず、*TAp51* 遺伝子の転写開始部位上流 1.7~1.2kbp が C2C12 細胞分化に伴う *TAp51* プロモーター活性化に必要であり、この中に筋分化に最も重要な転写因子 MyoD、E47 の結合コンセンサス配列 (E-box) が二ヶ所存在することを明らかにし、配列変異の解析から E-box 配列が分化後の *TAp51* プロモーター活性に重要であることを証明した。そして E47 または MyoD の強発現により *TAp51* プロモーター活性が E-box 配列依存的に上昇すること、C2C12 細胞での MyoD 強制発現が内在性 *TAp51* mRNA を誘導すること、さらに、E47、MyoD 蛋白質の E-box への配列特異的な結合が起きることを証明し、*TAp51* が骨格筋分化のマスター転写因子である MyoD、E47 両転写因子の直接的な制御を受けることを明らかにした。さらに、*p51* 発現アデノウイルスベクターを使って *p51* の各アイソフォームを C2C12 分化時に強制発現させた結果、*TAp51* 強発現では筋管の早期形成が、 $\Delta Np51B$ 強発現では筋細胞分化の顕著な阻害・筋分化マーカーの消失が観察されたことから、*p51* 遺伝子が骨格筋分化制御に働いていることを示した。

このように、矢吹仁人は、癌抑制遺伝子 *p53* 類似遺伝子として同定された *p51* が、正常の骨格筋分化において、筋分化制御因子による直接的な転写制御を受けているとともに、骨格筋分化の重要な制御因子として働いていることをはじめて明らかにした。これらの研究業績は、自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、矢吹仁人提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。